

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS
VON AZIDOSE UND ALKALOSE
SOWIE VON HYPOOSMOLALITÄT
UND HYPEROSMOLALITÄT
AUF DIE VERFORMBARKEIT
DICHTGETRENNTER ERYTHROZYTEN

Wolfgang-Stephan Hiltl

Disbui. München

1988



AUS DER KINDERKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. H.B. Hadorn

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUß VON AZIDOSE UND
ALKALOSE SOWIE VON HYPOOSMOLALITÄT UND HYPER-
OSMOLALITÄT AUF DIE VERFORMBARKEIT DICHTGE-
TRENNTER ERYTHROZYTEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang-Stephan H i l t l

aus
Füssen

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H.-J. Klose

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.B. Hadorn
Prof. Dr. Dr. H. Goerke

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 1988

Mit Dank gewidmet
meinen Eltern,
meiner Frau Elisabeth
und postum meinem
väterlichen Freund
Dr. med. vet. Georg Lechner



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555407_0013

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methodik	3
2.1. Gewinnung und Verarbeitung der Blutproben	3
2.2. Herstellung der Suspensionsmedien (Puffer)	4
2.3. Messung der Erythrozytenverformbarkeit, Beschreibung des Rheoskops	5
2.4. Halbautomatische Bildanalyse zur Erfassung der Erythrozytenverformung	7
2.5. Statistische Bearbeitung der Daten	8
3. Ergebnisse	10
3.1. Erythrozyten-Elongation bei Azidose und Alkalose	10
3.2. Erythrozyten-Elongation bei Hypo- und Hyperosmolalität	11
4. Diskussion	13
4.1. Erythrozyten-Elongation bei Azidose und Alkalose	13
4.2. Erythrozyten-Elongation bei Hypo- und Hyperosmolalität	17
5. Zusammenfassung	21
6. Abbildungen	23
7. Literaturverzeichnis	54
Lebenslauf	
Danksagung	

1. EINLEITUNG

Die Hauptfunktion der roten Blutkörperchen, der Erythrozyten, liegt im Transport von Sauerstoff und CO_2 . Sowohl im kleinen als auch im großen Kreislauf müssen die Erythrozyten Kapillaren passieren, deren Durchmesser (3-5 μm) kleiner als der mittlere Eigendurchmesser (7,5 μm) ist. Um ihrer Aufgabe gerecht zu werden, müssen die Zellen in der Lage sein, ihre Form zu ändern, sich zu verformen.

Störungen in der Mikrozirkulation, wie man sie z.B. in azidotischen Zuständen (z.B. protrahierter Schockzustand) und bei erhöhter Plasmaosmolalität (z.B. hyperosmolales Koma) findet, haben zahlreiche Forscher veranlasst, den Einfluß des pH-Wertes und der Plasmaosmolalität auf die Verformbarkeit der Erythrozyten zu untersuchen.

Dabei wurden verschiedene Meßmethoden verwendet. Eine mit Abnahme des pH-Wertes zunehmende Viskosität von Erythrozytensuspensionen fanden DINTENFASS und BURNARD (1966), MURPHY (1967), sowie GIOMBI und BURNARD (1970). Im Gegensatz dazu fanden RAND et al. (1968) und SCHMID-SCHÖNBEIN et al. (1971, 1973) in einem pH-Bereich von 6,9 bis 8,0 einen nur unbedeutenden Einfluß des pH-Wertes auf die Viskosität.

Über eine im sauren Milieu eingeschränkte Filtrierbarkeit von Erythrozyten berichten TEITEL und NICOLAU (1964), MURPHY (1967), sowie GROSS und HATHAWAY (1972), wobei jeweils verschiedene Filtrationstechniken verwendet wurden.

Voneinander abweichende Ergebnisse fanden Untersucher mit einer Mikropipettentechnik. SMITH und LA CELLE (1979) sowie GUMMELT et al. (1981) ermittelten eine verminderte Verformbarkeit der Erythrozyten mit fallendem pH-Wert. Letztere führten diesen Effekt überwiegend auf eine durch die Azidose bedingte Volumenzunahme der Zellen zurück. CRANDALL et al. (1978) sahen nur bei extremen pH-Erniedrigungen eine Änderung der Verformbarkeit.

Der Einfluß der Osmolalität auf die Verformbarkeit von Erythrozyten wurde ebenfalls zum Teil widersprechend beurteilt. Während GIOMBI und BURNARD (1970) einen Anstieg der Blutviskosität sowohl unter hypo- als auch unter hyperosmolalen Bedingungen bemerkten, berichteten MEISELMAN et al. (1967) von einer Verminderung der Viskosität bei Hypoosmolalität. SCHMID-SCHÖNBEIN und WELLS (1971) fanden ein Maximum der Erythrozyten-Filtrierbarkeit unter isoosmolalen und leicht hypoosmolalen Bedingungen. Bei Osmolalitäten über 600mmol/kg H₂O und unter 200mmol/kg H₂O sank die relative Flußrate als Maß für die Erythrozytenfiltrierbarkeit jedoch auf Null. MOHANDAS et al. bestätigten zwar 1980 mit einer neuen mikrophotographischen Methode, der Ektazytometrie, die Abnahme der Verformbarkeit normaler Erythrozyten bei sinkender Osmolalität; dehydrierte Zellen, die eine erhöhte innere Viskosität aufwiesen, zeigten jedoch eine verbesserte Verformbarkeit unter hypoosmolalen Bedingungen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Rheoskopie nach SCHMID-SCHÖNBEIN et al. (1969a, 1969b, 1973), die eine direkte Betrachtung der strömenden Zellen während der Messung der Erythrozytenverformung ermöglicht, die oben genannten Fragestellungen erneut zu untersuchen.

Dabei wurden zusätzlich unterschiedlich alte Erythrozytenpopulationen, die sich durch Dichtezentrifugation gewinnen lassen, untersucht und den jeweiligen pH- und Osmolalitätsbedingungen ausgesetzt. Hiermit sollte überprüft werden, ob und in wie weit jüngere, bzw. gealterte Erythrozyten in ihrem Verformbarkeitsverhalten auf die geänderten physikalisch-chemischen Bedingungen unterschiedlich reagieren. Ganz bewußt wurden pH-Bereich und Osmolalitätsbereich in etwa auf Größenordnungen beschränkt, wie sie allenfalls noch unter extremen pathologischen Zuständen vorgefunden werden können.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 Gewinnung und Verarbeitung der Blutproben

Aus der Vena cubitalis von freiwilligen, klinisch gesunden erwachsenen Probanden, wurden je 50ml Blut entnommen. Zur Verhinderung der Gerinnung wurden mit Kalium-EDTA beschichtete Röhrchen^a benützt. Aus dem Blut wurden mit dem Coulter-Counter^b folgende hämatologische Parameter bestimmt: Erythrozytenzahl, Hämatokritwert, Hämoglobinkonzentration, mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen und die Leukozytenzahl. Außerdem wurde die Vollblutviskosität bei verschiedenen Schergraden gemessen (s.u.). Pathologische Werte eines oder mehrerer der genannten Parameter führten zum Ausschluß des Probanden.

Das Blut wurde 10 Minuten bei Zimmertemperatur in einer HERAEUS-CHRIST-Zentrifuge (Labofuge II) bei 3700 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert, die auf den Erythrozyten liegende weiße Zellschicht, bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten ("buffy-coat"), wurde belassen. Um eine durch die Zentrifugation eventuell bereits stattgefundene Dichtentrennung der Zellen rückgängig zu machen, wurden die Blutröhrchen mehrmals vorsichtig geschüttelt. Zur Gewinnung gealterter und jüngerer Erythrozyten wurden die Zellen, analog früheren Untersuchungen (MURPHY 1973, SCHULZ et al. 1978, MAGNUS 1980, TILLMANN et al. 1980), nach ihrer Dichte getrennt: Glaskapillaren (Innendurchmesser 1,3mm, Länge 8cm) wurden mit je 80µl des Zellkonzentrates gefüllt, an einem Ende mit Spezialkitt^c verschlossen und 30 Minuten bei 12000 g zentrifugiert^d, wobei eine Temperaturerhöhung der Blutproben um 2° C gegenüber Raumtemperatur durch die Dichtezentrifugation in Kauf genommen werden mußte. Anschließend wurden die Kapillaren an der Grenze "buffy-coat" und Erythrozytensäule, bzw. Kitt und Erythrozytensäule mit einer Ampullen-säge durchtrennt.

Mit Hilfe eines Transferpetteors^e (5µl) wurden je 3µl von der Spitze, bzw. vom Boden der Erythrozytensäule entnommen und sofort

^a Fa. Sarstaedt, Nümbrecht, BRD

^b Fa. Coulter Electronics Ltd., Dunstable, England

^c Fa. Brand, Wertheim, BRD

^d Fa. Hawksley Ltd., London, England

^e Fa. Brand, Wertheim, BRD



in jeweils 100µl der verschiedenen Suspensionslösungen (s.u.) gegeben. Dabei entsprechen die Erythrozyten von der Spitze der Erythrozytensäule (obere Fraktion) einer Population von jüngeren Erythrozyten. Die Erythrozyten vom Boden der Erythrozytensäule (untere Fraktion) entsprechen einer Population von gealterten Erythrozyten.

2.2 Herstellung der Suspensionsmedien (Puffer)

Der Puffer wurde aus zwei Stammlösungen A und B hergestellt. Stammlösung A erhält man durch Einwaage von 27,6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und Auffüllen mit physiologischer Kochsalzlösung ad 1000ml, Stammlösung B durch Einwaage von 28,4g Na_2HPO_4 und ebenfalls Zugabe von 0,9%iger NaCl ad 1000ml. 26ml Lösung A und 174ml Lösung B werden mit aqua destillata ad 500ml verdünnt. Zu je 100ml dieser Gebrauchslösung werden 23g Dextran T 70^a einer Charge ($\overline{M}_w=73100$) zugegeben und 12-15 Stunden mit einem Magnetrührer gelöst (nach SCHMID-SCHÖNBEIN, pers. Mitteilung). In dieser "Rohlösung" werden folgende Parameter gemessen: Viskosität, pH-Wert und Osmolalität.

Die Viskosität wurde mittels eines WELLS-BROOKFIELD-Platte-Kegel-Viskosimeters^b bei 24° C gemessen. Der pH-Wert wurde mit dem pH-Meter pH521^c und einer Mikro-pH-Elektrode^d bestimmt. Die Osmolalität wurde nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung mit einem Halbmikro-Osmometer^e gemessen. Die "Rohlösung" ließ sich durch Hinzufügen geeigneter Korrekturmedien (s.u.) auf verschiedene pH-Werte (6,9; 7,1; 7,4; 7,7 und 8,2) bei gleicher Viskosität (32mPas $\pm$ 0,1%) und Osmolalität (299mmol/kg H_2O $\pm$ 4mmol/kg H_2O) einstellen. Analog dazu wurden Lösungen verschiedener Osmolalität (200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 und 600mmol/kg H_2O) bei identischer Viskosität (32mPas $\pm$ 0,1%) und pH (7,38 $\pm$ 0,01) hergestellt.

Nach Zugabe der Erythrozyten zu den Suspensionsmedien verschob sich der Wert der Lösung mit dem pH 8,2 auf einen pH von 8,0. Dafür ist die nicht mehr ausreichende Kapazität des Puffers im

^a Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

^b Fa. Colora Meßtechnik, München, BRD

^c Fa. WTW, Weilheim/Obb., BRD

^d Fa. Ingold, Frankfurt, BRD

^e Fa. Knauer, Eppelheim, BRD

Alkalischen ab einem pH-Wert von 7,9 verantwortlich. Die zur Kontrolle vor und nach jeder rheoskopischen Messung durchgeführten pH-Messungen zeigten die Konstanz der gewünschten Werte zwischen pH 6,9 und 8,0. Als Korrekturmedien wurden destilliertes Wasser, 1 N HCl, 1 N NaOH, H₂O-Dextranlösung (ca.90g/dl), und 9%ige NaCl-Lösung verwendet. Nach jeder Änderung eines Parameters (z.B. pH-Wert) mußten die beiden anderen (Osmolalität, Viskosität) ebenfalls kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert werden. Der Suspensionslösung wurde zusätzlich Albumin^a in einer Endkonzentration von 30mg/dl zur Verhinderung einer artefiziellen Stechapfelformbildung der Erythrozyten zugesetzt. Die "Rohlösung", die hochvisköse H₂O-Dextranlösung sowie die fertigen Suspensionslösungen wurden zur Entfernung evtl. Verunreinigungen durch eine Filternadel^b (Porendurchmesser 20µm) gepreßt.

Portionen von je 100µl Suspensionsmedium wurden in 1,5ml fassende "Eppendorfhütchen" aus Plastik gefüllt und bei minus 29° C eingefroren. Vor jedem der einzelnen Versuche erfolgte stichprobenartig eine Überprüfung der drei oben genannten Parameter. Die letzten Kontrollmessungen zeigten noch 2 Jahre nach Herstellung bzw. 1 1/4 Jahre nach der Durchführung des letzten Versuches keine Veränderung der Werte. Um eine bakteriologische bzw. mykologische Kontamination auszuschliessen, wurden die Lösungen zusätzlich im bakteriologischen Labor der Klinik untersucht.

2.3 Messung der Erythrozytenverformbarkeit, Beschreibung des Rheoskops

Zur Bestimmung der Verformbarkeit der Erythrozyten unter den gewünschten verschiedenen physikalisch-chemischen Bedingungen im Rheoskop, wurden jeweils 3µl der oberen Zellfraktion, der unteren Fraktion und der nicht fraktionierten Erythrozyten aus der Mitte der Erythrozytensäule in den vorbereiteten "Eppendorfhütchen" suspendiert. Der Volumenanteil der Erythrozyten im Suspensionsmedium war sehr niedrig (<1% Hämatokrit).

Aus der auf die Erythrozyten einwirkenden Scherkraft, die sich

^a Humanalbumin Fa. Behring, Marburg, BRD

^b Fa. Travenol, München, BRD

als Produkt der Suspensionsviskosität und des Schergrades der Platte-Kegel-Strömungskammer errechnen läßt, resultiert die Verformung der Zellen. Zentraler Bestandteil des von SCHMID-SCHÖNBEIN (1973) entwickelten, und von FISCHER (1978) beschriebenen Rheoskops^a ist die gegenrotatorische Platte-Kegel-Kammer (Abb.1), in der die Erythrozyten gesichert werden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine gering modifizierte Strömungskammer nach KLOSE (1983) verwendet, deren wesentliche Elemente im folgenden genauer erklärt werden: Unter der Scherrate ist der scheinbare Geschwindigkeitsgradient am Meßort zu verstehen, der sich aus der Bewegung von Platte und Kegel ergibt, diese drehen sich mit gleicher Frequenz gegeneinander. Über einem durch ein Potentiometer gesteuerten Synchronmotor^b werden Schergrade zwischen 40 und 450sec⁻¹ vorgegeben. In den vorliegenden Untersuchungen wurde bei Scherkräften von $\tau = 2,61\text{Pa} \pm 10\%$ und $\tau = 8,73\text{Pa} \pm 10\%$ gearbeitet. Wie bereits oben erklärt, errechnet sich die Scherkraft oder Schubspannung aus dem Produkt des Schergrades und der Viskosität des Suspensionsmediums. Ganz bewußt wurden die Untersuchungen sowohl bei sehr niedrigen Scherkräften als auch bei höheren Scherkräften durchgeführt. Niedrige Scherkraftwerte werden in vivo insbesondere im Bereich der Venolen und Venen, hohe Scherkraftwerte vor allem im Bereich der Arteriolen und Kapillaren gefunden (CHIEN et al. 1972).

Für die mikroskopische Beobachtung der Zellen wurde ein invertiertes Mikroskop mit Durchlicht-Interferenz-Kontrastoptik (Modell Diavert)^c, Objektiv 40/0, 65 p^d, verwendet. Die Betrachtung erfolgte durch einen Binokulartubus mit Brillenokularen und einer Lupenvergrößerung von 10-fach. Zur Mikrophotographie diente eine Kleinbildkamera mit Blitzgerät (Modell Leica MdA)^e und hochempfindliche Schwarz-Weiß-Filme HP5^f, entwickelt nach Angaben des Herstellers. Je 10µl der Erythrozytensuspensionen wurden in die Platte-Kegel-Kammer gebracht, je eine Aufnahme in Ruhe und je eine Aufnahme bei den gewünschten Scherraten angefertigt. Die strömenden Zellen, die sich in einer mittleren Strömungsschicht befinden, erscheinen für das Auge stationär. Entlang

^a Fa. Effenberger, München, BRD

^b Fa. SWF, Bietigheim, BRD

^{c d e} Fa. Leitz, Wetzlar, BRD

^f Fa. Ilford GmbH, Neu-Isenburg, BRD

der Strömungsrichtung elongieren sich die Zellen in Abhängigkeit der Scherkraft und ihrer Verformbarkeit. In der Projektion des Mikroskopes erscheinen die Zellen als zum Teil spitz zulaufende ovaläre Scheiben. Der in Richtung des Strömungsfeldes erscheinende Durchmesser wird als scheinbare Länge L' , der dazu senkrecht stehende Durchmesser als Breite B bezeichnet. Senkrecht zur Projektionsebene orientieren sich die Zellen entsprechend des Strömungsfeldes der Kammer, zur Strömungsrichtung um den Winkel α geneigt (FISCHER 1978), (Abb.2).

Ganz entscheidend für die Untersuchungsaussage ist die Reproduzierbarkeit der vorgegebenen Strömungskräfte. Zwangsläufig ergibt sich aus der Geometrie der Platte-Kegel-Strömungskammer, daß als Fehlerursache vor allem die Reproduzierbarkeit des Abstands von Platte und Kegelspitze (im Idealfall nahezu 0) in Betracht kommt. Mit Hilfe eigener optischer Messungen wurde festgestellt, daß der Platte-Kegel-Abstand am Meßort (etwas lateral von der Kegelspitze) mit $24 \pm 1,7 \mu\text{m}$ relativ konstant war. Diese Schwankung führt maßgeblich zu einer "fehlerhaften" Schubspannungsberechnung in der Größenordnung von 10% (Material-Fehlerbreite). Höhere Präzision läßt sich derzeit nur mit unverhältnismäßig hohem technischen Aufwand bezüglich der Geometrie der Platte-Kegel-Strömungskammer erzielen.

2.4 Halbautomatische Bildanalyse zur Erfassung der Erythrozytenverformung

Als Maß der Verformbarkeit der Zellen diene in Anlehnung an TAYLOR (1934) die Elongation, die sich nach der Formel

$$E' = \frac{L' - B}{L' + B} \quad \text{für } L' < B \text{ gilt } E' = 0$$

berechnet. Da jedoch, wie oben ausgeführt, nur die scheinbare

Länge L' messbar ist, läßt sich streng genommen auch nur von einer scheinbaren Elongation E' sprechen. Im weiteren Text wird der Einfachheit halber von Elongation gesprochen, dabei handelt es sich jedoch immer um die scheinbare Elongation.

Zur Auswertung wurden die Negative mit Hilfe eines Diaprojektors^a auf ein Graphiktablett^b projiziert (Vergrößerung ca. 30-fach, Auflösung 0,1mm). Durch nacheinander Antippen der Punkte P1-P4 (Abb.2), mit Hilfe eines Fadenkreuzcursors wurden die Koordinaten von L' und B eingegeben. Das Graphiktablett war an einem MOP-Videoplan Bildanalysecomputer^c angeschlossen. Dieser berechnete aus den Koordinaten die Werte L' und B. Daraus wurde mit der oben angegebenen Formel die Elongation berechnet und die einzelnen Werte in dafür angelegten Dateien abgespeichert. Pro Bild wurden ca. 45 bis 50 Zellen ausgewertet. Zellen mit einem negativen Elongationswert wurden mit einem Wert von $E'=0$ abgespeichert, da ein solcher nicht definiert ist.

2.5 Statistische Bearbeitung der Daten

Mit Hilfe der Software CP/M2.2, Version 5.42 13.3.84 SN² 01570^d des MOP-Videoplan ließen sich die folgenden Parameter zur Beschreibung der Erythrozytenpopulationen berechnen: Anzahl der Werte (n), arithmetisches Mittel der Elongationen (E'), Standardabweichung (s), relativer Variationskoeffizient (V_r), Minimum und Maximum, Median (E'), 25 und 75 % Perzentile (Q_1 bzw. Q_2) und das Dichtemittel (D). Ebenfalls ließen sich der F-Test auf Varianzgleichheit und der KOLMOGOROFF-SMIRNOFF-Test zur Prüfung der Gleichheit der Verteilungsform auf dem 10 %-Niveau durchführen. Zur Feststellung von Unterschieden zwischen den einzelnen Zellpopulationen wurde der gebräuchliche, zweiseitige STUDENT-t-Test für unverbundene Stichproben benutzt ($p < 0,0001$). Zusätzlich wurden die Werte mit Hilfe des zweiseitigen U-Tests nach MANN und WHITNEY verglichen ($p < 0,0001$), der für sämtliche Signifikanzberechnungen verwendet wurde. Mit Hilfe des Rechners ließen sich außerdem Histogramme der Elongationen herstellen. Sämtlichen

^a Fa. Liesegang, Düsseldorf, BRD

^{b c d} Fa. Kontron, Echting, BRD

statistischen Tests liegen die von SACHS (1984) beschriebenen Methoden zugrunde.

3. ERGEBNISSE

Um eine umfassende Analyse der erhaltenen Daten zu ermöglichen, werden zwei sich ergänzende Methoden der Darstellung gewählt. Einmal wird die Häufigkeitsverteilung der Elongationswerte in Form eines Histogramms aufgezeigt. In den Darstellungen 3 bis 8 und 15 bis 20 sind die Klassenhäufigkeiten als Funktion der Erythrozyten Elongationswerte (in Stufen von 0,05) aufgetragen. In den anderen Abbildungen (9 bis 14 und 21 bis 26) sind die Medianwerte relativ zu den physiologischen Ausgangswerten (pH 7.4, Osmolalität 300mmol/kg H₂O) in Abhängigkeit von den jeweiligen physikalisch-chemischen Parametern dargestellt. Als Maß für die Streuung der Meßwerte um die Medianwerte dient das erste und dritte Quartil (25-, bzw. 75-Percentile). Die Abbildungen zeigen jeweils das Elongationsverhalten für die Fraktionen der jüngeren und der gealterten Erythrozytenpopulationen, sowie für die nicht fraktionierten Erythrozytenpopulationen. Wie erwähnt, wird sowohl das Elongationsverhalten der Erythrozyten bei absolut niedrigen Schubspannungswerten als auch bei hohen Schubspannungen gezeigt.

3.1 Erythrozyten-Elongation bei Azidose und Alkalose

Die Abb.3 bis 5 bzw. Abb.6 bis 8 zeigen die Histogramme bei verschiedenen pH-Werten und einer mittleren Schubspannung von 2,61 respektive 8,73Pa. Abb. 3 und 6 zeigen das Verteilungsmuster der nicht fraktionierten Zellen, Abb. 4 und Abb. 7 der oberen ("jüngeren") Fraktion und Abb. 5 und Abb. 8 der unteren ("gealterten") Fraktion.

Allein aus den Histogrammen läßt sich bei zunehmender Alkalisierung, eine Abflachung und/oder eine Verschiebung nach links erkennen. Am geringsten ausgeprägt ist dies bei den jüngeren Zellen der oberen Fraktion, deutlicher bei den nicht fraktionierten Zellen und am deutlichsten bei den gealterten Erythrozyten der unteren Fraktion erkennbar. Dabei finden sich für jede Erythrozytenpopulation bei den hohen Schubspannungswerten jeweils

· naturgemäß höhere Elongationswerte verglichen zu den niedrigen Schubspannungswerten. Prinzipiell verhalten sich die Elongationen unabhängig vom vorgegebenen Schubspannungsbereich identisch. Deutlich wird die erheblich eingeschränkte Erythrozyten-Elongation unter alkalotischen-Bedingungen.

Ein Vergleich der Medianwerte bestätigt und verdeutlicht die bereits dargestellten Ergebnisse. Eine Erniedrigung des pH-Wertes (Azidose) führt bei den jüngeren und bei den nicht fraktionierten Erythrozyten zu keiner deutlichen Änderung der Elongationswerte (Abb.9-10,12-13). Dies gilt sowohl für den hohen als auch für den niedrigen Schubspannungsbereich. Die Elongationswerte der gealterten Erythrozyten hingegen lassen sich durch eine Senkung des pH-Wertes sogar signifikant verbessern (Abb.11,14). Alkalose führt bei beiden Schubspannungen und in allen Erythrozytenfraktionen zu signifikant erniedrigten Elongationswerten. Der Grad der Elongationsverminderung nimmt sowohl mit dem mittleren Alter der Populationen als auch mit dem Ausmaß der Alkalose zu.

3.2 Erythrozyten-Elongation bei Hypo- und Hyperosmolalität

Die Abbildungen 15 bis 20 zeigen wiederum die Histogramme bei mittleren Schubspannungen von 2,61 respektive 8,73Pa: Mit steigender Osmolalität findet sich in allen sechs Darstellungen eine zunehmende Verschiebung nach links, d.h. zu erniedrigten Elongationswerten. Diese Tendenz ist am ausgeprägtesten bei den gealterten Zellen der unteren Erythrozytenfraktion. Ab einer Hyperosmolalität von 400mmol/kg H₂O sind hier praktisch keine elongierten Zellen mehr vorhanden. Dies gilt für beide Schubspannungsbereiche. Die nicht fraktionierten Zellen und die jüngeren Zellen der oberen Fraktion lassen sich im Vergleich zu den gealterten Erythrozyten in dem hohen Osmolalitätsbereichen besser verformen.

Beim Vergleich der Medianwerte (Abb.21-26) zeigt sich ebenfalls, daß die nicht fraktionierten Erythrozyten mit abnehmender Osmola-

lität signifikant verbesserte Elongationswerte aufweisen, bzw. mit zunehmender Osmolalität signifikant verschlechterte Elongationswerte gefunden werden. Dies gilt sowohl im niedrigen als auch im hohen Schubspannungsbereich. Ganz besonders ausgeprägt findet sich die Elongationserhöhung bei Hypoosmolalität, bzw. Elongationsverminderung bei Hyperosmolalität bei den gealterten Erythrozyten der unteren Fraktion. Eine signifikante, wenn auch nur geringgradige Verbesserung der Elongation der jüngeren Zellen tritt erst bei einer Hypoosmolalität von 200mmol/kg H_2O auf. Mit zunehmender Osmolalität kommt es auch bei den jüngeren Erythrozyten zu einer signifikanten Elongationsverminderung, die jedoch selbst bei 450mmol/kg H_2O deutlich geringer ausgeprägt ist als in der nicht fraktionierten oder gealterten Erythrozytenpopulation. Nicht dargestellt sind Versuchsergebnisse zum Elongationsverhalten der Erythrozyten bei extremer Hyperosmolalität (500, bzw. 600mmol/kg H_2O). Schon in der rheoskopischen Betrachtung zeigte sich, daß sich die jüngeren und nicht fraktionierten Zellen ab 500mmol/kg H_2O , die gealterten Zellen bereits ab 450mmol/kg H_2O , zu Konglomeraten zusammenfügten. Somit war eine Elongationsmessung einzelner Zellen nicht sinnvoll. Bemerkenswert ist jedoch, daß auch unter extremsten Bedingungen neben ausgeprägten Konglomeraten noch vereinzelte verformte Zellen zu finden sind (Abb.30). In den folgenden Abbildungen sind zur Illustration beispielhaft unterschiedlich gut verformte Erythrozytenpopulationen dargestellt (Abb.27-29).

4. DISKUSSION

Menschliche Erythrozyten verlieren während ihres Lebens von durchschnittlich 120 Tagen Zellwasser und Membranpartikel. Dies führt zu einer Volumenabnahme und einer Dichtezunahme des Zellinhalts (BOCCI 1981, NASH und MEISELMAN 1981).

Das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bleibt bei alten und jungen Zellen gleich. Der Oberflächenindex, der den Überschuß an Membranfläche, der über das minimal zum Einschluß des Volumens (sphärische Zelle) hinausgeht, beschreibt, nimmt jedoch mit zunehmenden Alter ab (LINDERKAMP und MEISELMAN 1982).

Altersabhängige Veränderung der Erythrozytenverformbarkeit wurden mit verschiedenen Methoden gefunden. So zeigt sich eine mit zunehmenden Erythrozytenalter erhöhte Viskosität von Erythrozytensuspensionen (USAMI et al. 1971), eine reduzierte Filtrierbarkeit von Erythrozyten durch Mikroporen (TILLMAN et al. 1980), eine Erhöhung des zur Aspiration von Einzelerythrozyten in Mikropipetten notwendigen Druckes (LA CELLE und ARKIN 1970) und eine reduzierte Elongation von Erythrozyten unter Scherung (CORY und MEISELMAN 1978, KLOSE et al. 1981). Die altersabhängige Elongationsverminderung von Erythrozyten konnte auch in den eigenen Untersuchungen für hohe und niedrige Scherbereiche bestätigt werden.

Somit kann in Übereinstimmung mit der Literatur ein reduziertes Verformbarkeitsverhalten gealterter Erythrozyten im Vergleich zu jüngeren Erythrozytenpopulationen als gesichert angesehen werden, nachdem die erwähnten verschiedensten Techniken zumindest qualitativ zu identischen Resultaten geführt haben.

4.1. Erythrozytenelongation bei Azidose und Alkalose

DINTENFASS und BURNARD untersuchten 1966 mit verschiedenen Methoden die Viskosität von Erythrozytensuspension bei einem Hämatokrit von 80% in einem pH-Bereich von 6,9-7,4. Sie fanden dabei mit abnehmenden pH einen Anstieg der Viskosität in einem weiten

Schubspannungsbereich. MURPHY fand 1967 für Erythrozytensuspensionen im Plasma bei einem Hämatokritwert von 60% bei einer Reduktion des pH-Wertes von 8,0 auf 6,6 nur in sehr niedrigen Schubspannungsbereichen eine Zunahme der Viskosität. In nur geringfügig erhöhten Schubspannungsbereichen fand er jedoch keine signifikante Viskositätsänderung. Die von DINTENFASS in allen Scherbereichen gefundene pH-Abhängigkeit der Viskosität führt MURPHY auf methodische Fehler zurück. Eine signifikante Viskositäts-erhöhung fand MURPHY ausschließlich bei extremer Azidose. In von ihm ebenfalls durchgeführten Filtrationsversuchen führten hingegen schon geringe pH-Wert-Verminderungen zu einer Einschränkung der Filtrierbarkeit von Erythrozytensuspensionen. RAND fand 1968 bei in-vitro-Untersuchungen auch bei niedrigen Hämatokritwerten (30%), für pH-Werte zwischen 6,8 und 7,9 nur einen geringfügigen Einfluß auf die Viskosität. Er fand dies auch im niedrigen Schubspannungsbereich. Seine Untersuchungen von Patienten mit sowohl metabolischer als auch respiratorischer Azidose bzw. Alkalose ergaben eine Streuung der Werte im Bereich der physiologischen Norm. GIOMBI und BURNARD 1970 fanden hingegen bei einer pH-Erniedrigung von 7,4 auf 6,9 eine Zunahme der Blutviskosität. Gleichzeitig führte die pH-Erniedrigung sowohl zu einer Hämatokriterhöhung als auch zu einer Reduktion der Osmolalität des Plasmas.

Bei Filtrationsexperimenten mit Erythrozytensuspensionen fanden TEITEL und NICOLAU (1964) unter extremen azidotischen Bedingungen (pH-Wert-Erniedrigung bis unter 5) eine erhebliche Reduktion der Erythrozytenfiltrierbarkeit. In einem pH-Bereich von 7,4 bis 6,9, entsprechend den in der vorliegenden Arbeit gewählten azidotischen Bedingungen, fanden sich keine signifikanten Veränderungen. Ebenfalls keinen Einfluß auf die Filtrierbarkeit von Erythrozyten bei pH-Werten dieses Bereichs fand SCHMID-SCHÖNBEIN und WELLS 1971. Bei pH-Werten unter 6,8 ergab sich jedoch eine deutliche Reduktion der Filtrierbarkeit, die von ihm später in einer weiteren Studie bestätigt wurde (SCHMID-SCHÖNBEIN 1973). Mit einer

Mikropipettentechnik fanden SMITH und LA CELLE 1979 erst bei einer Erniedrigung des pH-Wertes unter 6,0 eine drastische Abnahme der Verformbarkeit. Im Vergleich zu dem physiologischen pH-Wert führten pH-Veränderungen bis zu 7,0 bzw. 8,0 zu keinem signifikanten Einfluß auf die Verformbarkeit. Die Verformbarkeitsverminderung unter den erwähnten extremen pH-Bedingungen wurde durch eine drastische Abnahme der Löslichkeit des die Membran stabilisierenden Proteins Spektrin erklärt. CRANDALL und Mitarbeiter (1978) fanden ebenfalls mit einer Mikropipetten-technik bei Untersuchungen der Erythrozytenoberflächenelastizität in einem pH-Bereich von 10,5 bis 4,5 Veränderungen, allerdings erst unter zunehmend azidotischen Bedingungen ab einen pH-Wert von etwa 7,0. Mit einer Mikropipettentechnik fanden GUMMELT und Mitarbeiter 1981 schon bei gering erniedrigten pH-Werten unter 7,4 eine Verschlechterung der Verformbarkeit, die mit einer Zunahme des mittleren Zellvolumens einherging. Im alkalischen pH-Bereich über 7,4 fanden sie keine Veränderung. Die Autoren führten die reduzierte Erythrozytenfiltrierbarkeit im sauren Bereich hauptsächlich auf die Grössenzunahme der Erythrozyten zurück. In den vorliegenden eigenen Messungen wurde eine Methode zur Erfassung der Erythrozytenverformung verwendet, bei der die Erythrozytengrösse (bzw. das Erythrozytenvolumen) für die Verformbarkeitsmessung mathematisch bedingt irrelevant ist. Grundsätzlich sind daher rheologische Methoden bei denen die Erythrozytengrösse als Parameter in die Verformbarkeitsmessung eingehen kann (Filtrationsmethoden, Mikropipettenmethoden) nur mit Vorsicht zu interpretieren. Zellgrößen- unabhängige Methoden wie die hier verwendete rheoskopische Elongationsmessung und die Ektazytometrie (MOHANDAS et al. 1980) scheinen für die Bestimmung der Verformbarkeit von einzelnen Erythrozyten geeigneter. Diese These wird z.B. unterstützt durch die widersprüchlichen Untersuchungsbefunde bei der Bestimmung der Verformbarkeitseigenschaften von fötalen Erythrozyten, die verglichen mit adulten Erythrozyten erheblich grösser sind (nach LINDERKAMP et al. 1986 verhält sich das mittlere Erythrozytenvolumen umgekehrt proportional zum Ges-

tationsalter). Sowohl GROSS und HATHAWAY 1972 als auch TILLMANN et al. 1977 fanden in Filtrationsversuchen eine erhebliche Verminderung der Filtrierbarkeit von Erythrozytensuspensionen, während LINDERKAMP 1982 und 1986 und KLOSE 1983 keinerlei Einschränkung der Verformbarkeit von fötalen Früh- und Neugeborenenerythrozyten im Vergleich zu adulten Erythrozyten mit der rheoskopischen Elongationsmessung fanden.

Teilweise in Übereinstimmung mit Befunden der oben genannten Autoren ergab sich trotz der methodischen Unterschiede (Filtrationsmethode, Viskositätsmessung, Mikropipettentechniken) für azidotische Bedingungen bis zur pH-Erniedrigung von 6,9 keine Veränderung der Erythrozytenverformung in den vorliegenden Messungen. Dieses gilt für eine Erythrozytenmischpopulation und eine junge Subpopulation von Erythrozyten sowohl im hohen als auch im niedrigen Schubspannungsbereich. Erklärt werden könnten diese Befunde durch den von GUMMELT et al. beschriebenen Effekt der Zunahme des mittleren Zellvolumens (MCV), welche eine Herabsetzung der Viskosität des Zellinhaltes (Hämoglobininlösung) und so günstigere Verformungsbedingungen bewirkt. Offensichtlich scheinen die, durch die MCV-Zunahme unter Azidose bewirkte, Verkleinerung des Oberflächen/Volumenverhältnisses und andere Veränderungen der Membraneigenschaften in dem untersuchten pH-Bereich nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Bei der gealterten Erythrozytenfraktion kann die sogar deutlich verbesserte Erythrozytenverformung in Azidose dadurch erklärt werden, daß der Effekt einer Viskositätsverminderung des Zellinhaltes die Effekte anderer Parameter, die eine reduzierte Erythrozytenverformung bewirken können, überwiegt.

Bei den unter alkalischen Bedingungen untersuchten Erythrozyten findet sich eine für beide Schubspannungsbereiche und sämtliche Zellfraktionen herabgesetzte Erythrozytenverformung. Andere Autoren haben mit den verschiedensten Methoden diesen Effekt nicht erfassen können. Es muß betont werden, daß die Verformungsänderungen in der nicht fraktionierten und besonders in der

jungen Erythrozytenpopulation, vor allem im hohen Schubspannungsbereich relativ geringfügig sind. Die erhebliche Verformbarkeitsreduktion der gealterten Erythrozytenfraktion kann am ehesten durch ausgeprägte Viskositätserhöhung des Erythrozyteninhaltes erklärt werden. Offenbar trägt die Verschlechterung der Erythrozytenverformung bei dieser Population zum Verhalten der nicht fraktionierten Population nur wenig bei.

4.2. Erythrozyten-Elongation bei Hypo- und Hyperosmolalität

MEISELMAN et al.(1967) fanden bei gleichbleibendem Hämatokrit in einer leicht hypoosmolalen Lösung von ca. 250mmol/kg H_2O eine geringere Viskosität als in einer hyperosmolalen Lösung von ca. 350mmol/kg H_2O . Sie fanden außerdem eine lineare Beziehung zwischen der Veränderung der Osmolalität und der daraus resultierenden Veränderung des Zellvolumens. Die Veränderung des Zellvolumens verhielt sich demnach umgekehrt proportional zur Veränderung der Osmolalität. GIOMBI und BURNARD untersuchten 1970 ebenfalls viskosimetrisch den Einfluß sowohl der Hyper- als auch der Hypoosmolalität. Bei einer Erniedrigung der Viskosität von isoosmolalen Verhältnissen auf einen Wert von ca. 200mmol/kg H_2O sahen sie zunächst eine Zunahme der Viskosität, die jedoch von einer Zunahme des Hämatokrits von etwa 46% auf 55% begleitet war. Bei einer Reduktion der Erythrozytenmasse auf den Ausgangshämatokrit von 46% fanden sie analog zu MEISELMAN et al. bei 200mmol/kg H_2O eine im Vergleich zu isoosmolalen Verhältnissen geringere Vollblutviskosität.

Die Erhöhung der Viskosität von isotonen Verhältnissen auf ca. 375mmol/kg H_2O führte zu einer Zunahme der Viskosität, die von einer Abnahme des Hämatokrits von 50% auf 41% begleitet war. Nach Korrektur des Hämatokrits auf den Ausgangswert von 50% fanden sie eine noch ausgeprägtere Zunahme der Viskosität. Bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellsuspensionen in der Hyperosmolalität fanden diese Autoren eine deutliche Zunahme der Aggregation der roten Blutzellen im Vergleich zu hypoosmolalen Bedingungen, die

per se zu einer Viskositätssteigerung beitragen kann.

SCHMID-SCHÖNBEIN und WELLS untersuchten 1971 den Einfluß der Osmolalität mittels einer Filtrationsmethode. Ausgehend von isotonen Verhältnissen fanden sie mit steigender Osmolalität eine deutliche Reduktion der Flußrate von Erythrozytensuspensionen durch Milliporefilter, die bei Werten zwischen 550 und 600mmol/kg H₂O zum Erliegen kam. Bei gering reduzierter Osmolalität konnten sie ein geringfügiges Anwachsen der Flußrate zeigen. Ausgeprägtere Hypoosmolalität führte jedoch zu einer Abnahme der Flußrate. Die Autoren untersuchten weiterhin die Viskosität von gepackten Zellen mit einem Hämatokrit von 99% in Abhängigkeit der Osmolalität sowie die Viskosität einer Hämoglobininlösung mit dazu identischer Hämoglobinkonzentration. Die Hämoglobinkonzentration der gepackten Zellen fiel mit abnehmender Osmolalität. Ihren niedrigsten Wert hatte sie bei einer Osmolalität von 169mmol/kg H₂O mit 27g/dl. Aus zunehmender Osmolalität resultierte eine Steigerung der Hämoglobinkonzentration, die ihren höchsten Wert von 38,4g/dl bei einer Osmolalität von 600mmol/kg H₂O erreichte. Die niedrigste Viskosität der gepackten Zellen fand sich bei einer Osmolalität von 250mmol/kg H₂O. Eine Änderung der Osmolalität sowohl in den hypo- als auch in den hyperosmolalen Bereich führte zu einer Viskositätssteigerung. In der Hypoosmolalität war der Anstieg der Viskosität jedoch deutlich ausgeprägter als unter hyperosmolalen Bedingungen. Im Gegensatz dazu zeigte die Hämoglobininlösung mit fallender Osmolalität einen Abfall der Viskosität. Mit steigender Osmolalität ab 300mmol/kg H₂O einen erheblich ausgeprägteren Viskositätsanstieg (siehe Abb. 31 nach SCHMID-SCHÖNBEIN 1971). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse stimmen mit den Befunden der genannten Voruntersucher trotz methodischer Unterschiede weitgehend überein, wenn der gewählte Osmolalitätsbereich von 200-600mmol/kg H₂O betrachtet wird. Hypoosmolalität führt bei nicht fraktionierten Erythrozytenpopulationen sowohl in dem niedrigen als auch in dem höheren Schubspannungsbereich zu einer leicht verbesserten Elongation der Zellen, also somit einer besseren Verformung. Hyperosmolalität hingegen führt zu deutlich

eingeschränkter Erythrozytenverformung bis gegen 0 für beide Schubspannungsbereiche.

Erklären lassen sich die vorliegenden Ergebnisse sehr gut durch die von SCHMID-SCHÖNBEIN et al. 1971 durchgeführten Experimente zur Viskosität von Hämoglobininlösungen und Suspensionen gepackter Erythrozyten (Abb. 31): Da die Viskosität der Hämoglobininlösung die Viskosität des Zellinneren repräsentiert, sind die leicht verbesserten Verformungseigenschaften der Erythrozyten in Hypoosmolalität mit dem geringen Viskositätsabfall der Hämoglobininlösung vereinbar. Die deutliche Reduktion der Erythrozytenverformbarkeit in Hyperosmolalität korreliert mit der deutlichen Steigerung der Viskositätszunahme der Hämoglobininlösungen ab einen Osmolalitätswert von 300mmol/kg H₂O.

Auch die von diesen Autoren erhobene Viskositätssteigerung der Suspension gepackter Erythrozyten mit steigender Osmolalität sind mit den hier vorliegenden Elongationsveränderungen vereinbar. Die in der gleichen Untersuchung gefundene extreme Viskositätserrhöhung dieser gepackten Zellsuspension bei einer Hypoosmolalität von 200mmol/kg H₂O, die den vorliegenden Ergebnissen zu widersprechen scheint, muß am ehesten auf eine Auswirkung der Hypoosmolalität auf Eigenschaften der Zellmembran zurückgeführt werden, die der Viskositätsabnahme der Hämoglobininlösung in diesen Bereich entgegengesetzt gerichtet sind. In der hier verwendeten rheoskopischen Methode scheint die geänderte Viskosität des Zellinhalts der relevante Parameter zu sein. Unterstützt wird diese These durch die Verformbarkeitsänderungen in Abhängigkeit von der Osmolalität für die junge Subpopulation von Erythrozyten sowie die gealterte Subpopulation. Der wesentliche Unterschied zwischen jungen und gealterten Erythrozyten liegt in der mittleren Hämoglobinkonzentration und damit der Viskosität des Zellinhaltes.

MOHANDAS et al. untersuchten 1980 mittels einer Laserdiffraktionstechnik (Ektazytometrie) ebenfalls den Einfluß der Osmolalität auf das Verformbarkeitsverhalten von Erythrozyten. Sie fanden dabei im hypertonen Milieu eine deutliche Einschränkung der Verformbarkeit. Bei Werten über 450mmol/kg H₂O fanden sich

nahezu keine verformten Erythrozyten mehr. In Hypoosmolalität fand sich erst in einem Bereich unter 200mmol/kg H₂O eine deutliche Reduktion der Verformbarkeit. In dem Bereich zwischen isosmolalen Verhältnissen und etwa 200mmol/kg H₂O war kein signifikanter Unterschied der Verformbarkeit messbar. Die Befunde stimmen mit den Ergebnissen der rheologischen Elongationsmessung weitgehend überein. Zusätzliche Untersuchungen dieser Autoren an dehydrierten Erythrozyten zeigten eine drastische Verbesserung der Verformbarkeit mit abnehmender Osmolalität. Diese Befunde gehen konform mit den deutlich gebesserten Elongationswerten der gealterten Erythrozytensubpopulation in Hypoosmolalität (Abb. 23 und 26). Die gealterten Erythrozyten können in Relation zur Gesamtpopulation als dehydrierte Zellen mit erhöhter Hämoglobinkonzentration angesehen werden (BOCCI 1981, NASH und MEISELMAN 1981).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Untersuchung sollte der Einfluß physikalisch-chemischer Größen, wie Azidose bzw. Alkalose und Hypo-, bzw. Hyperosmolalität auf das Verformbarkeitsverhalten von Erythrozyten gemessen werden. Die Untersuchungen beschränkten sich bewußt auf einen pH-Wertebereich von 6,9 bis 8,0 und einen Bereich der Osmolalität von 200 bis 600 mmol/kg H₂O. Solche zum Teil extremen Milieu-Verschiebungen lassen sich unter gewissen pathologischen Zuständen auch in vivo finden.

Es wurde in den vorliegenden Messungen nicht nur die Gesamtpopulation der Erythrozyten untersucht, sondern ganz gezielt geprüft, ob und wie Subpopulationen von Erythrozyten verschiedenen Alters auf die Milieuveränderungen reagieren. Als Maß der Erythrozytenverformung wurde die Änderung der Elongation einzelner Zellen unter definierten Strömungsbedingungen im Rheoskop bestimmt. Mit dieser Methode wird die Zellverformung unabhängig von der Zellgröße erfaßt. Im Vergleich dazu war die Erythrozytengröße in früheren rheologischen Studien ähnlicher Fragestellung ein mitbestimmender, methodischer Parameter.

Als ein wesentliches Ergebnis der Untersuchung ergab sich, daß in der Azidose selbst bei pH-Wert-Erniedrigungen auf 6,9 keine Verminderung der Erythrozytenverformbarkeit zu finden war. Die Subpopulationen gealterter Erythrozyten zeigten unter azidotischen Bedingungen sogar eine bessere Verformung. Alkalose beeinträchtigte die Erythrozytenverformbarkeit hingegen deutlich. Der Grad der Elongationsverminderung nahm hierbei sowohl mit dem mittleren Alter der Population als auch mit dem Ausmaß der Alkalose zu.

Die Verformbarkeitsmessungen bei Osmolalitätsänderungen ergaben folgende Resultate:

Hypoosmolalität führte zu deutlich besserer Zellverformung verglichen mit physiologischen Bedingungen. Auch hier war das Ausmaß der Veränderungen bei gealterten Erythrozyten am ausgeprägtesten.

Hingegen führte selbst geringgradige Hyperosmolalität in allen untersuchten Populationen zu beträchtlicher Verminderung der Erythrozyten-Verformung. Eine Bewertung des Verformbarkeitsverhaltens einzelner Erythrozyten bei Osmolalitätswerten über 450 mmol/kg H₂O war auch bei hohen Scherkräften wegen exzessiver Bildung von Zell-Konglomeraten nicht sinnvoll.

Als bemerkenswert kann zusammenfassend festgestellt werden, daß gealterte Erythrozyten auf die genannten Milieuveränderungen besonders ausgeprägt reagieren; die Subpopulationen jüngerer Erythrozyten erweisen sich dagegen in ihrem Verformungsverhalten unter gleichen Bedingungen als äußerst widerstandsfähig.

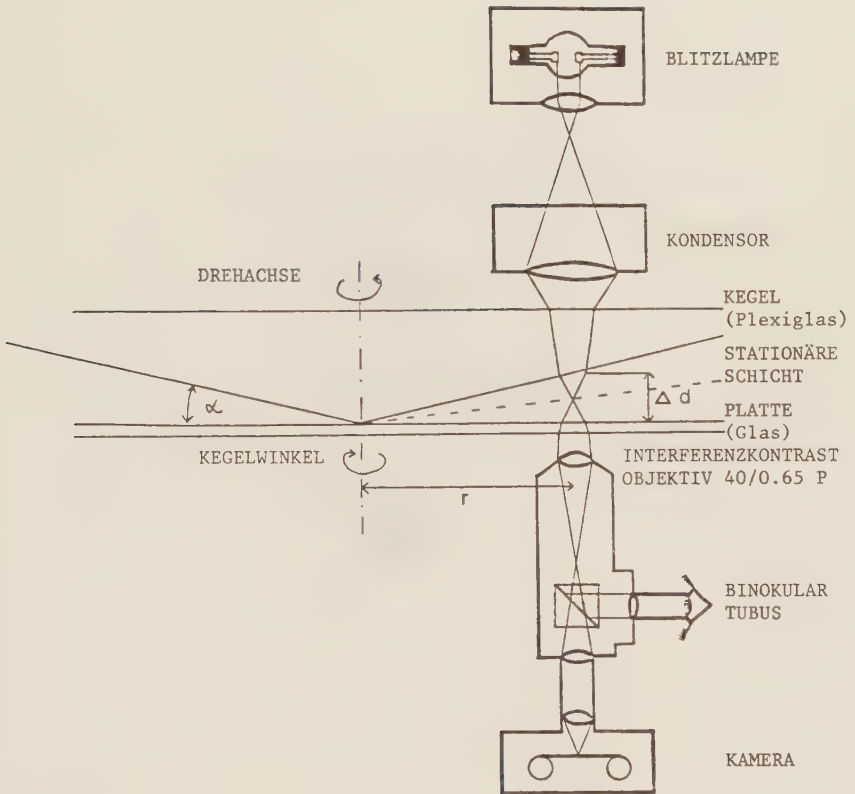


Abb. 1:

Schematische Darstellung der rheoskopischen Meßanordnung
mit gegenrotatorischer Platte-Kegel-Strömungskammer
(nach Klose 1983)

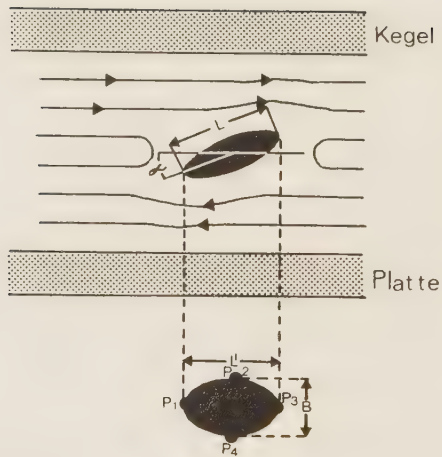


Abb.2: Schematische Darstellung eines Erythrozyten im Scherfeld des Suspensionsmediums, gezeichnet in zwei Schnittebenen (nach Fischer 1978)

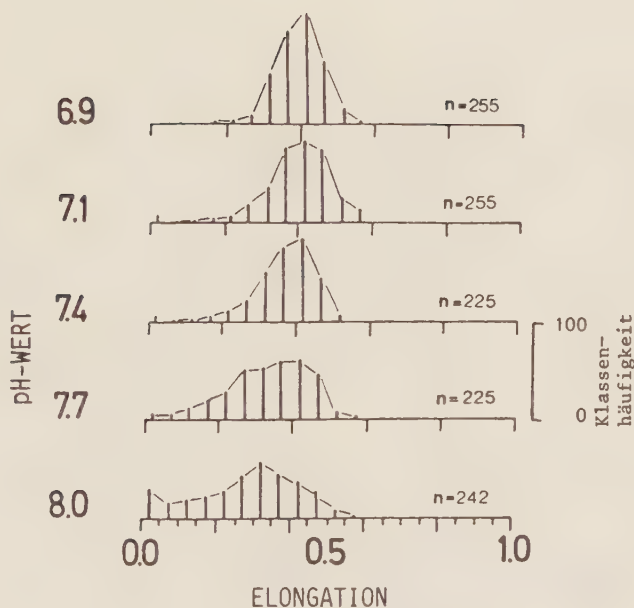


Abb.3: Verteilung der gemessenen Elongationswerte nicht fraktionierter Erythrozyten bei unterschiedlichen pH-Werten und einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

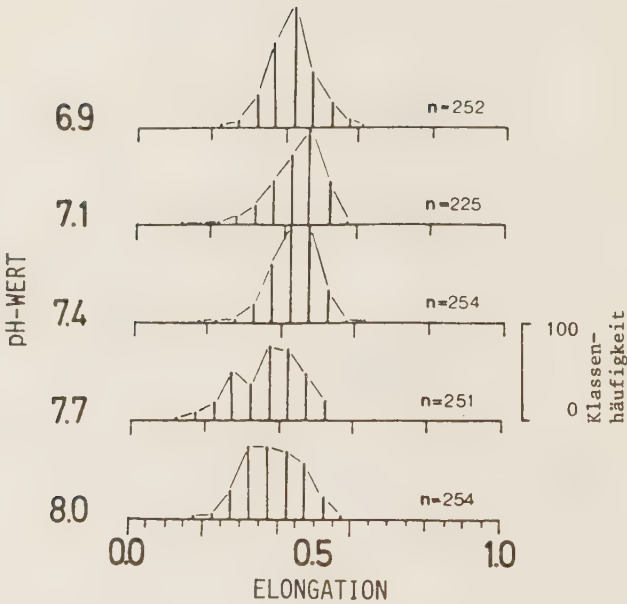


Abb.4: Verteilung der gemessenen Elongationswerte der jüngeren Erythrozyten Subpopulation bei unterschiedlichen pH-Werten und einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

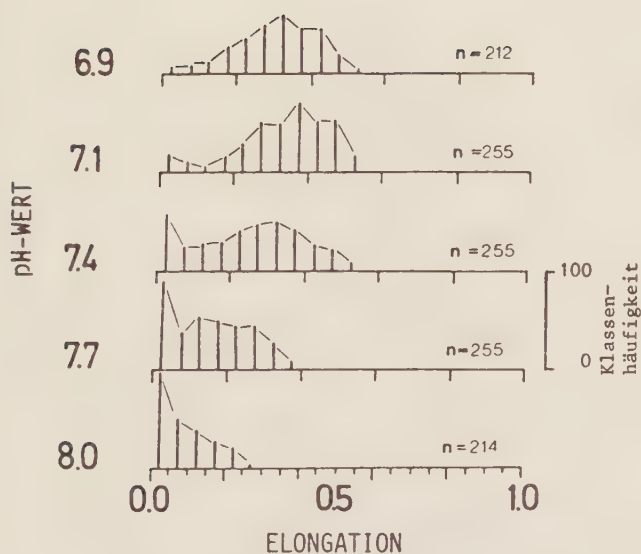


Abb.5: Verteilung der gemessenen Elongationswerte der älteren Erythrozyten Subpopulation bei unterschiedlichen pH-Werten und einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

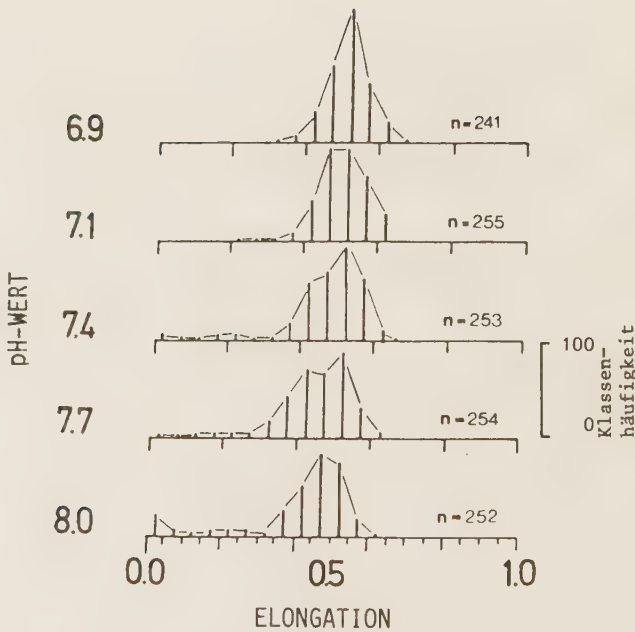


Abb.6: Verteilung der gemessenen Elongationswerte nicht fraktionierter Erythrozyten bei unterschiedlichen pH-Werten und einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

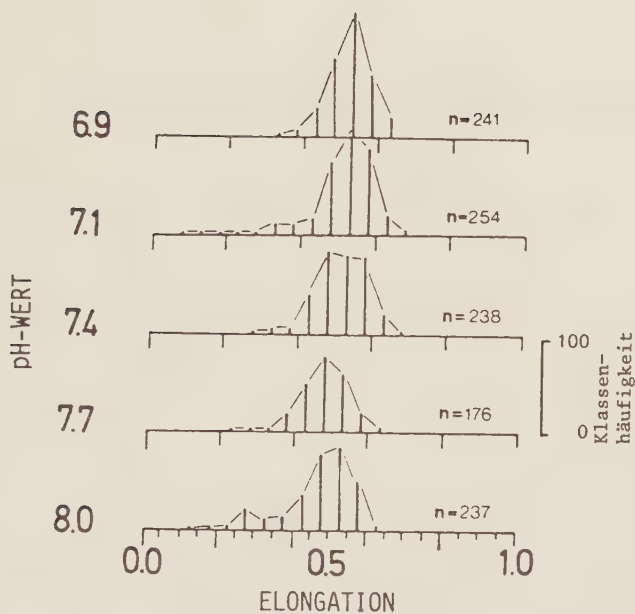


Abb.7: Verteilung der gemessenen Elongationswerte der jüngeren Erythrozyten Subpopulation bei unterschiedlichen pH-Werten und einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

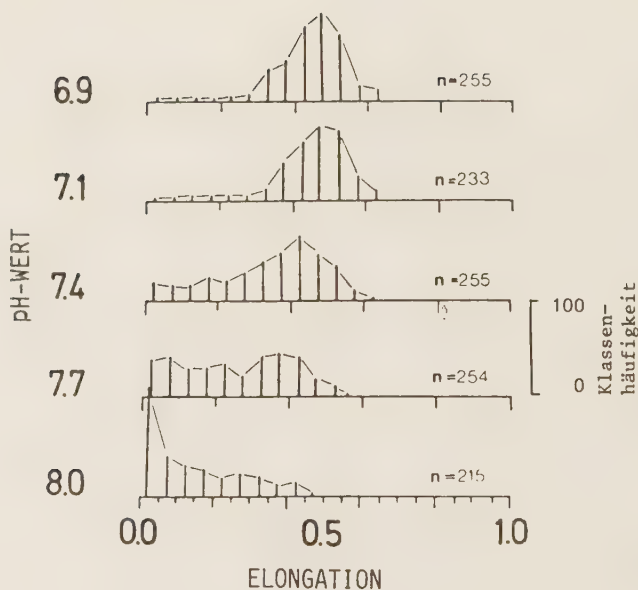


Abb.8: Verteilung der gemessenen Elongationswerte der älteren Erythrozyten Subpopulation bei unterschiedlichen pH-Werten und einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

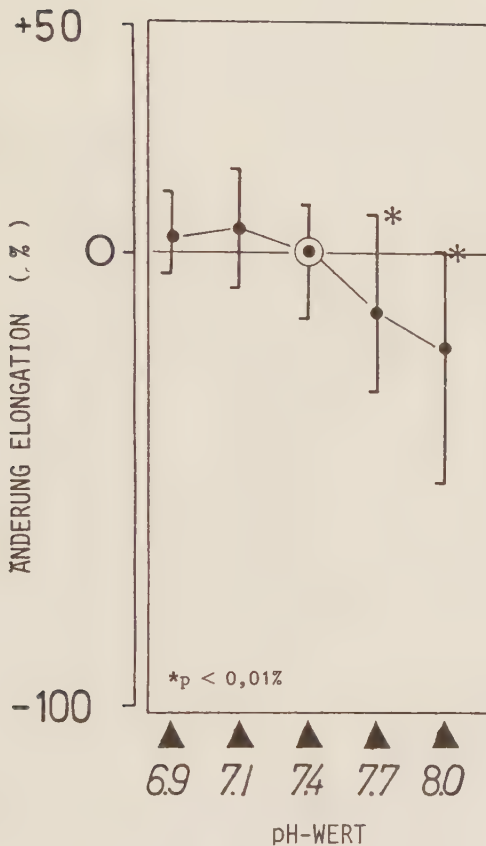


Abb.9: pH-abhängige relative Abweichung der mittleren Elongation nicht fraktionierter Erythrozyten bezogen auf nicht fraktionierte Erythrozyten unter Normalbedingungen (pH 7,4, Osmolalität 300 mmol/kg H_2O) bei einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (J) und dritten (7) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (⊙, $\bar{E}=0,39$) dargestellt.

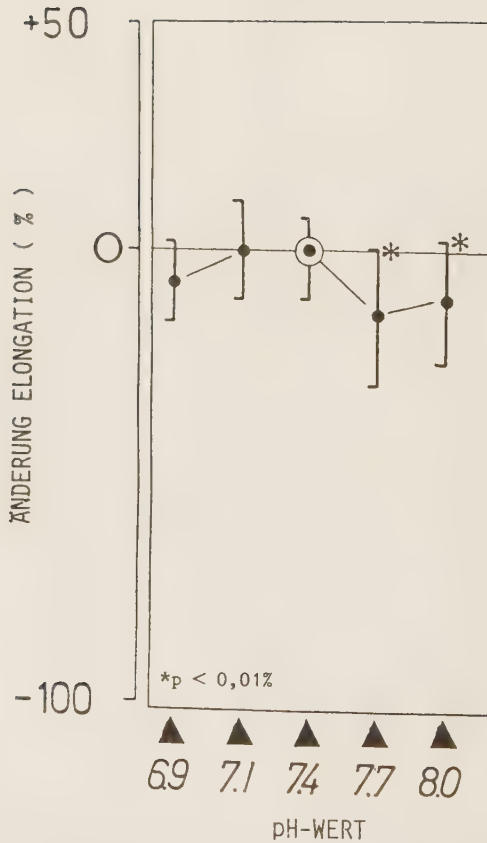


Abb.10: pH-abhängige relative Abweichung der mittleren Elongation jüngerer Erythrozyten bezogen auf die jüngere Erythrozyten Subpopulation unter Normalbedingungen (pH 7,4, Osmolalität 300 mmol/kg H₂O) bei einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (J) und dritten (T) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (○, $\bar{E}=0,44$) dargestellt.

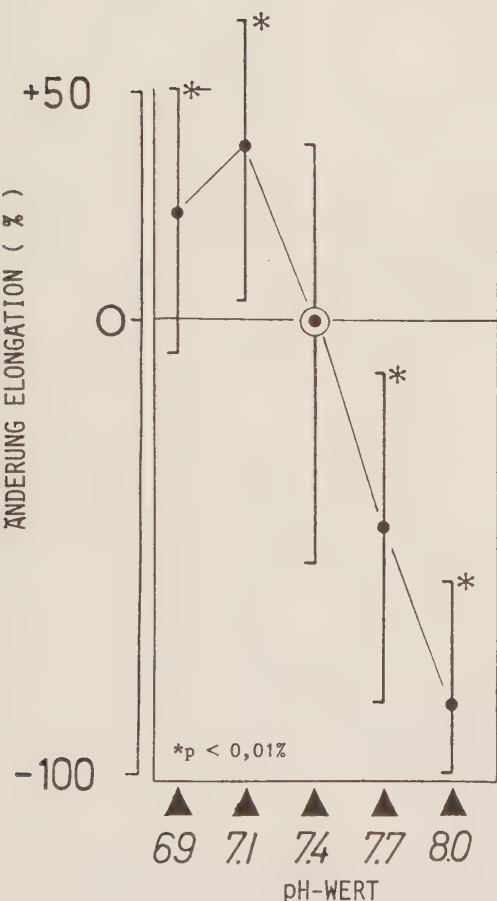


Abb.11: pH-abhängige relative Abweichung der mittleren Elongation älterer Erythrozyten bezogen auf die ältere Erythrozyten Subpopulation unter Normalbedingungen (pH 7,4, Osmolalität 300 mmol/kg H₂O) bei einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (↓) und dritten (↑) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (●, $\bar{E}=0,26$) dargestellt.

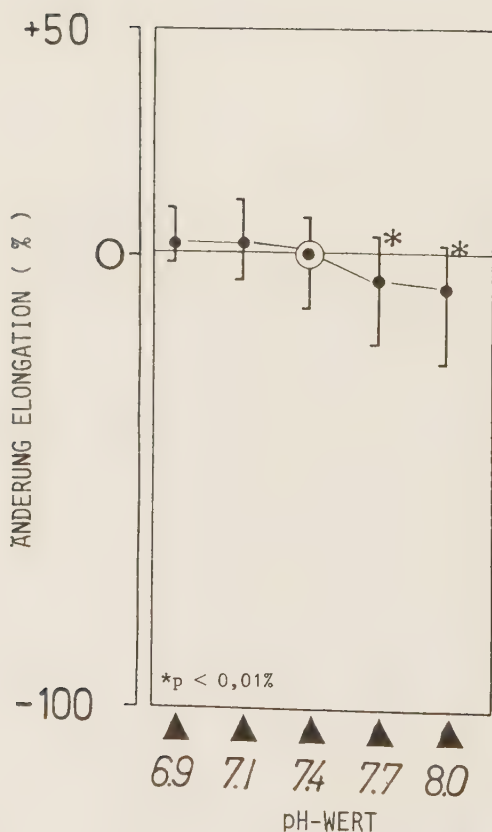


Abb.12: pH-abhängige relative Abweichung der mittleren Elongation nicht fraktionierter Erythrozyten bezogen auf nicht fraktionierte Erythrozyten unter Normalbedingungen (pH 7,4, Osmolalität 300 mmol/kg H₂O) bei einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (J) und dritten (I) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (•, $\bar{E}=0,50$) dargestellt.

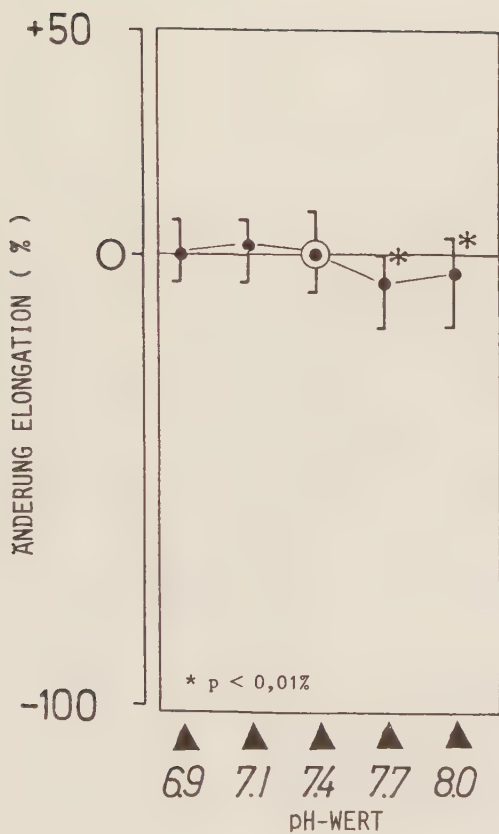


Abb.13: pH-abhängige relative Abweichung der mittleren Elongation jüngerer Erythrozyten bezogen auf die jüngere Erythrozyten Subpopulation unter Normalbedingungen (pH 7,4, Osmolalität 300 mmol/kg H₂O) bei einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (▼) und dritten (▲) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (●, $\bar{E}=0,51$) dargestellt.

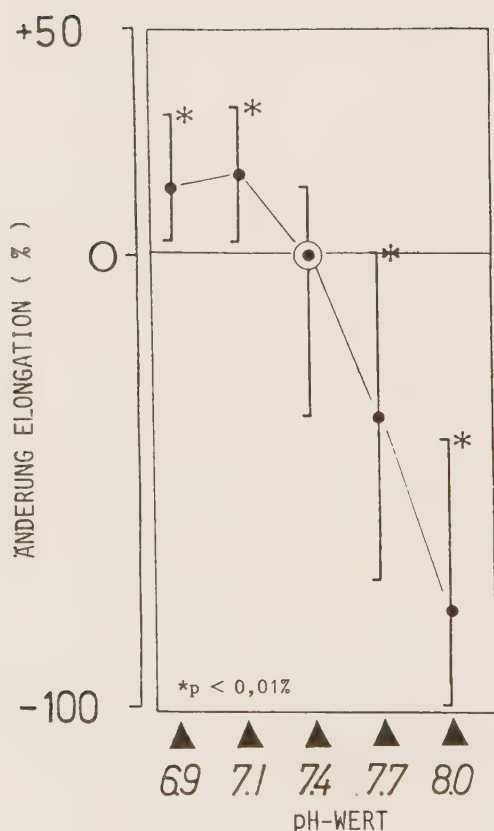


Abb.14: pH-abhängige relative Abweichung der mittleren Elongation älterer Erythrozyten bezogen auf die ältere Erythrozyten Subpopulation unter Normalbedingungen (pH 7,4, Osmolalität 300 mmol/kg H₂O) bei einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (J) und dritten (7) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (⊙, $\bar{E}=0,39$) dargestellt.

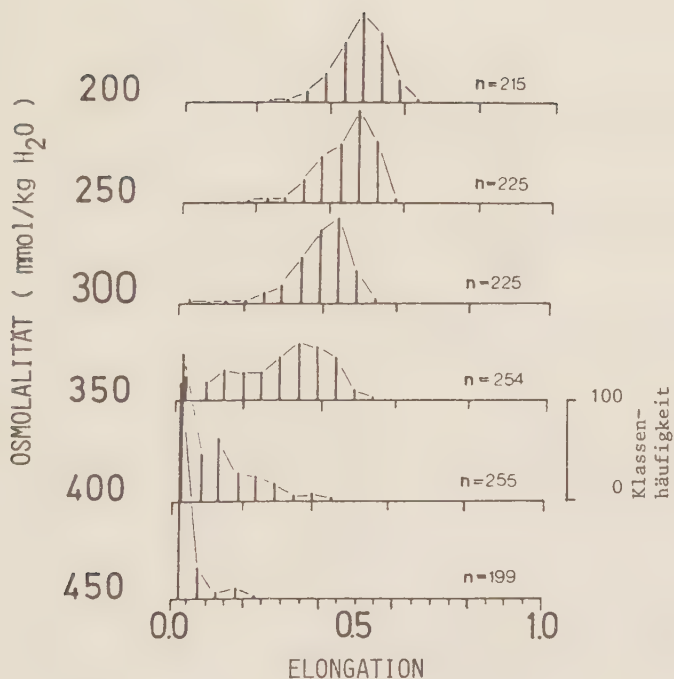


Abb.15: Verteilung der gemessenen Elongationswerte nicht fraktionierter Erythrozyten bei unterschiedlichen Osmolalitätswerten und einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

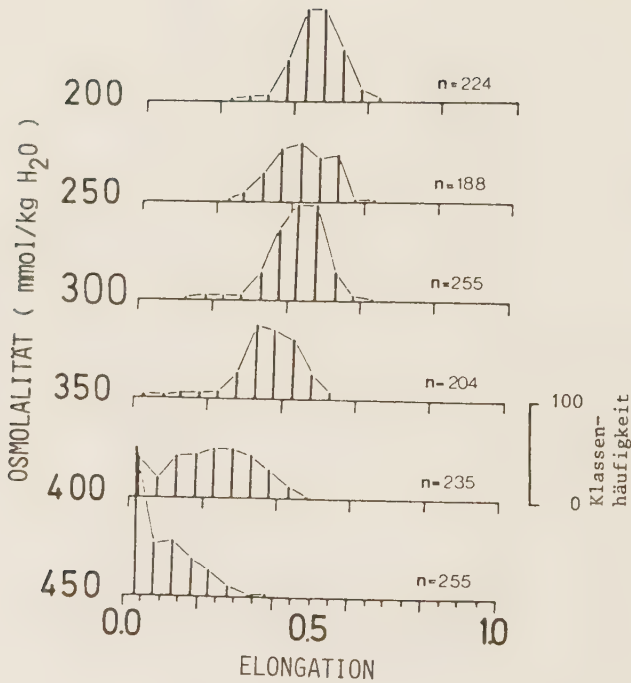


Abb.16: Verteilung der gemessenen Elongationswerte der jüngeren Erythrozyten Subpopulation bei unterschiedlichen Osmolalitätswerten und einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

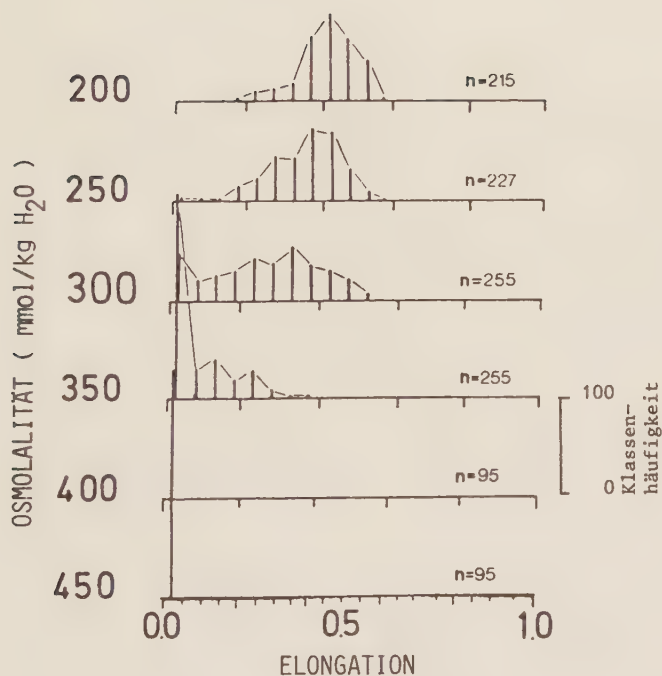


Abb.17: Verteilung der gemessenen Elongationswerte der älteren Erythrozyten Subpopulation bei unterschiedlichen Osmolalitätswerten und einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

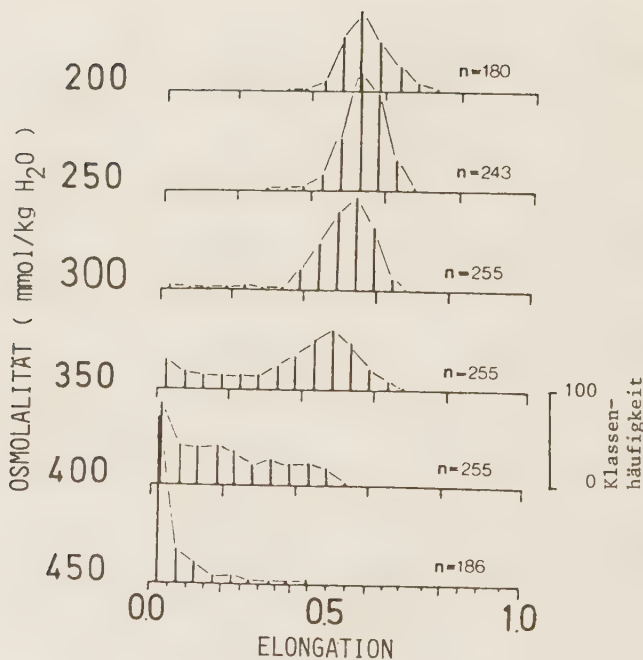


Abb.18: Verteilung der gemessenen Elongationswerte nicht fraktionierter Erythrozyten bei unterschiedlichen Osmolalitätswerten und einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

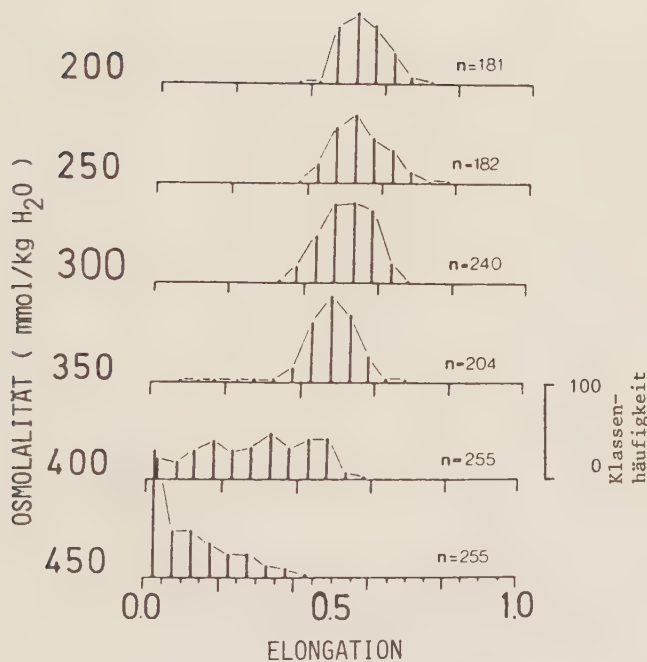


Abb.19: Verteilung der gemessenen Elongationswerte der jüngeren Erythrozyten Subpopulation bei unterschiedlichen Osmolalitätswerten und einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von E=0,05,

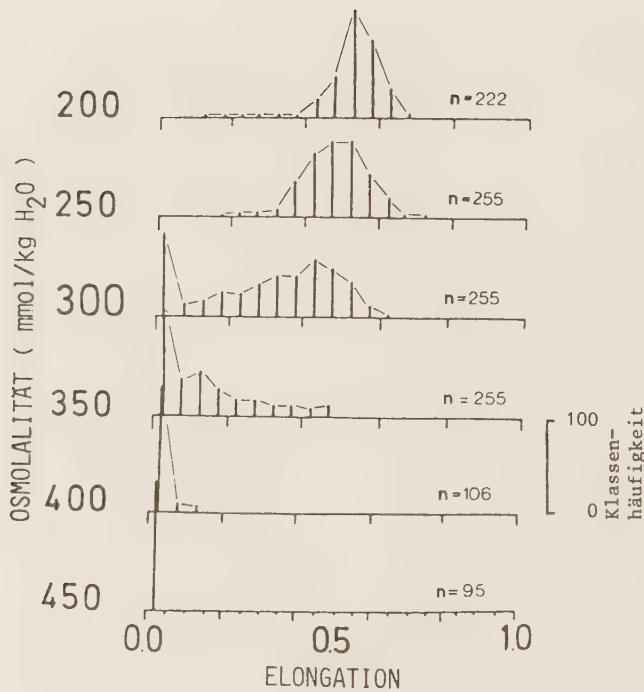


Abb.20: Verteilung der gemessenen Elongationswerte der älteren Erythrozyten Subpopulation bei unterschiedlichen Osmolalitätswerten und einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Darstellung als Histogramm mit einer Klassenbreite von $E=0,05$.

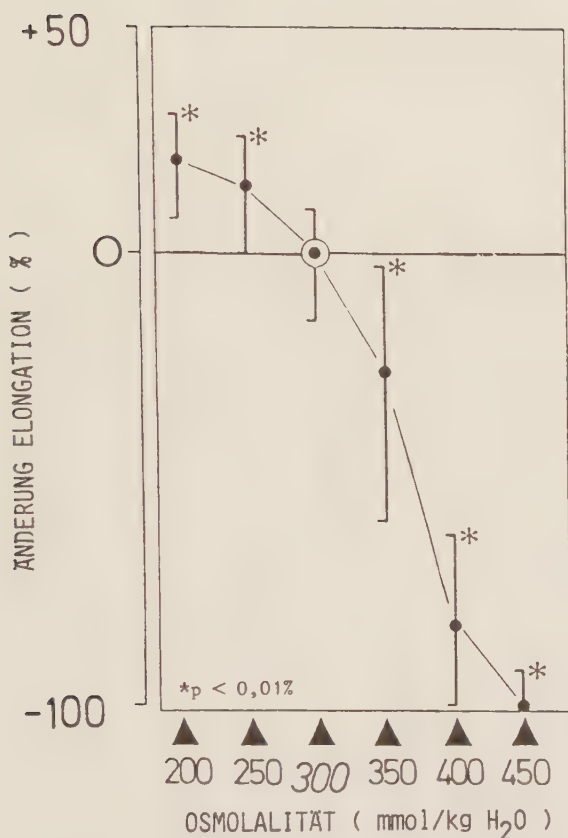


Abb.21: Osmolalitätsabhängige relative Abweichung der mittleren Elongation nicht fraktionierter Erythrozyten bezogen auf nicht fraktionierte Erythrozyten unter Normalbedingungen (Osmolalität 300 mmol/kg H₂O, pH 7,4) bei einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (J) und dritten (J) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (⊙, $\bar{E}=0,39$) dargestellt.

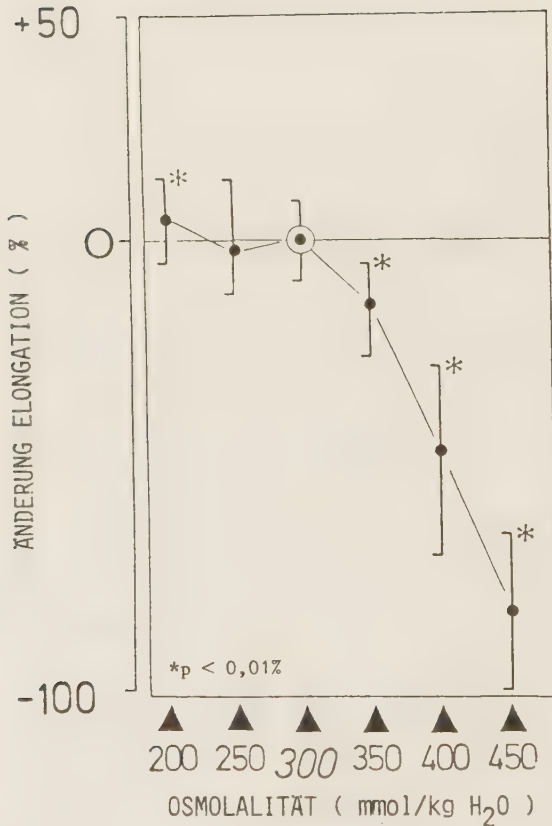


Abb.22: Osmolalitätsabhängige relative Abweichung der mittleren Elongation jüngerer Erythrozyten bezogen auf die jüngere Erythrozyten Subpopulation unter Normalbedingungen (Osmolalität 300 mmol/kg H₂O, pH 7,4) bei einer mittleren Schubspannung von 2,61. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (J) und dritten (I) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (⊙, $\bar{E}=0,43$) dargestellt.

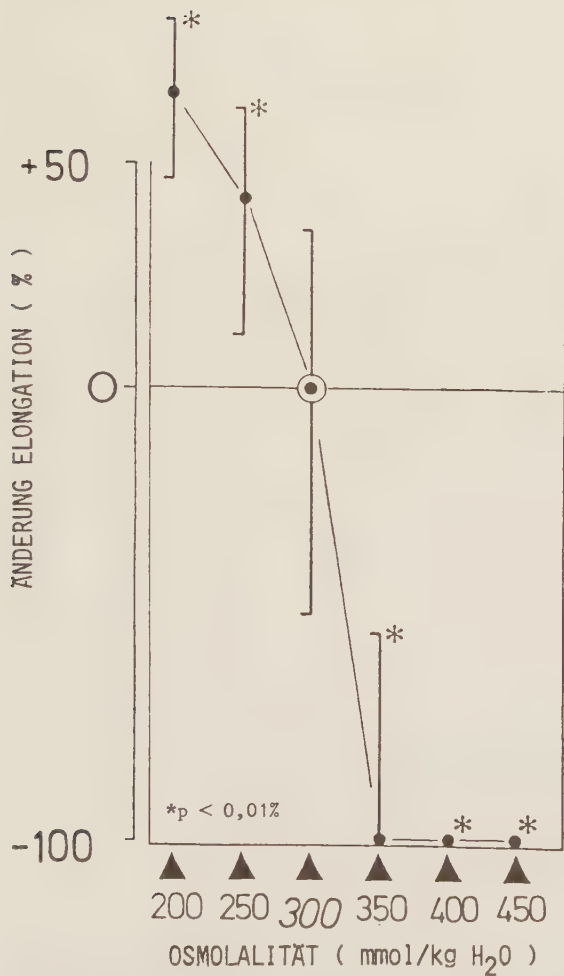


Abb.23: Osmolalitätsabhängige relative Abweichung der mittleren Elongation älterer Erythrozyten bezogen auf die ältere Erythrozyten Subpopulation unter Normalbedingungen (Osmolalität 300 mmol/kg H₂O, pH 7,4) bei einer mittleren Schubspannung von 2,61 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (J) und dritten (J) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (⊙, $\bar{E}=0,26$) dargestellt.

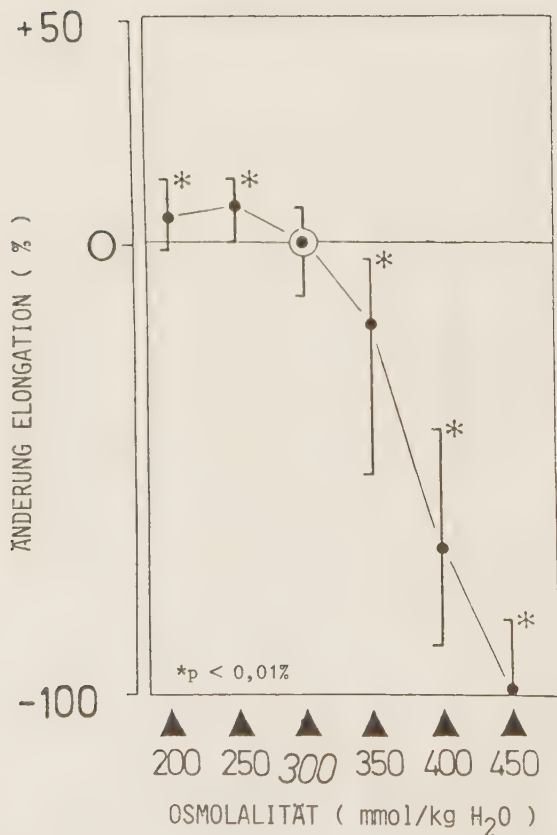


Abb.24: Osmolalitätsabhängige relative Abweichung der mittleren Elongation nicht fraktionierter Erythrozyten bezogen auf nicht fraktionierte Erythrozyten unter Normalbedingungen (Osmolalität 300 mmol/kg H₂O, pH 7,4) bei einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (J) und dritten (J) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (●, $\bar{E}=0,50$) dargestellt.

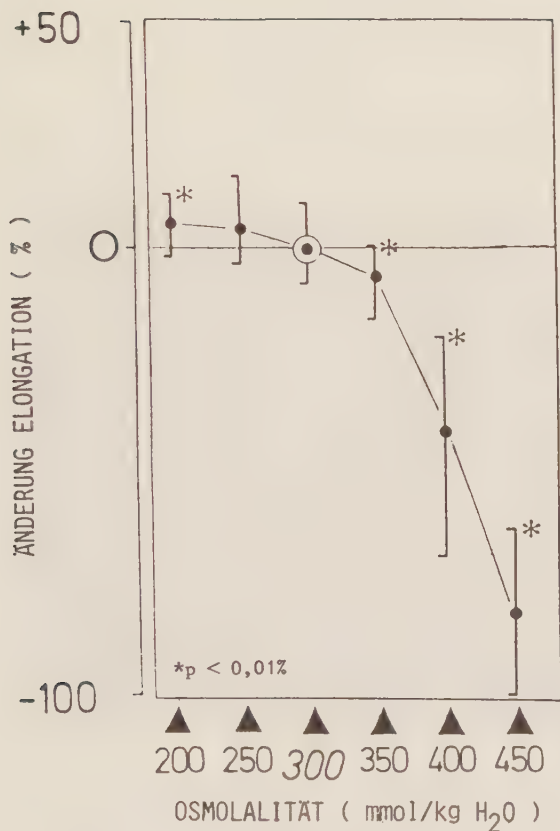


Abb.25: Osmolalitätsabhängige relative Abweichung der mittleren Elongation jüngerer Erythrozyten bezogen auf die jüngere Erythrozyten Subpopulation unter Normalbedingungen (Osmolalität 300 mmol/kg H₂O, pH 7,4) bei einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (●) sowie der ersten (J) und dritten (J) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (●, $\bar{E}=0,51$) dargestellt.

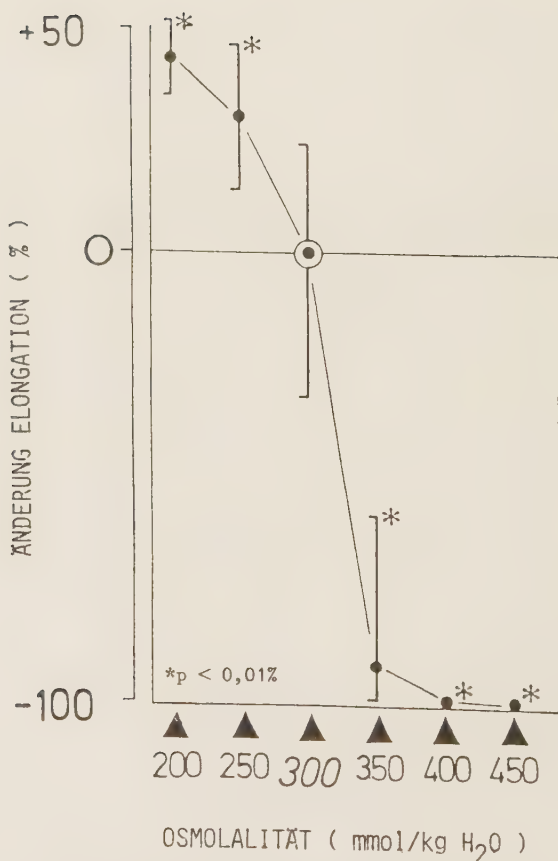


Abb.26: Osmolalitätsabhängige relative Abweichung der mittleren Elongation älterer Erythrozyten bezogen auf die ältere Erythrozyten Subpopulation unter Normalbedingungen (Osmolalität 300 mmol/kg H₂O, pH 7,4) bei einer mittleren Schubspannung von 8,73 Pa. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abweichung der Mediane (•) sowie der ersten (J) und dritten (7) Quartile vom Median der Erythrozyten unter Standardbedingungen (◎, $\bar{E}=0,37$) dargestellt.



Abb. 27: Beispiel für nichtfraktionierte Zellen
unter physiologischen Bedingungen
bei einer Schubspannung von 8.73 Pa

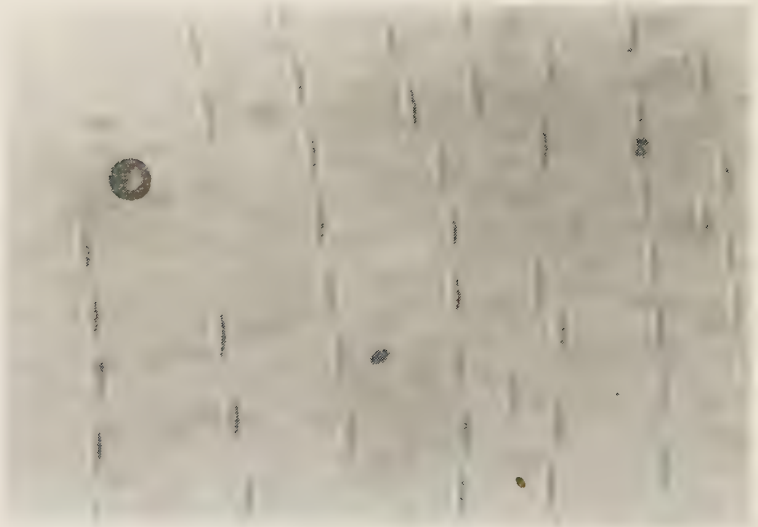


Abb. 28: Beispiel für nichtfraktionierte Zellen
bei 200 mmol/kg H₂O und einer Schub-
spannung von 8.73 Pa



Abb. 29: Beispiel für Erythrozyten der jungen Subpopulation bei 450 mmol/kg H₂O und einer Schubspannung von 8.73 Pa



Abb. 30: Beispiel für Erythrozyten der älteren Subpopulation bei 600 mmol/kg H₂O und einer Schubspannung von 2.61 Pa

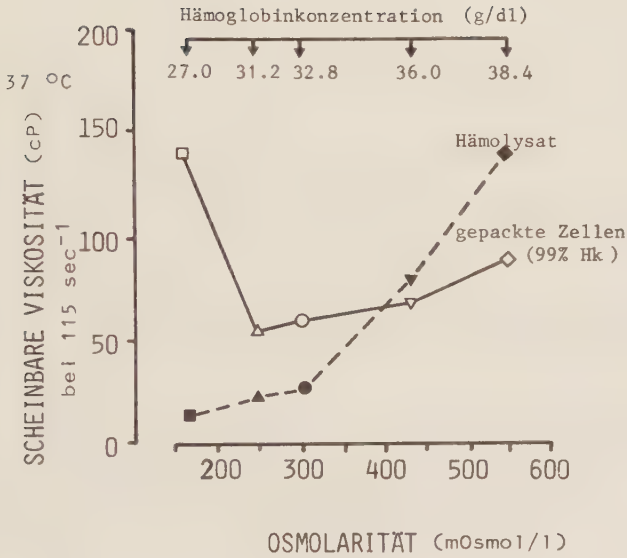


Abb. 31:

Einfluß der Osmolarität auf die scheinbare Viskosität (115 sec⁻¹) von gepackten Erythrozyten und deren Hämolysat

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. BOCCI, V.
Determinants of erythrocytes aging: A reappraisal
Br.J.Haematol. 48:515 (1981)
2. CHIEN, S.
Present state of blood rheology
In: Hemodilution
Eds.: Messmer, K., Schmid-Schönbein, H.
Karger, Basel p 1 (1972)
3. CORRY, W.D., MEISELMAN, H.J.
Centrifugal method of determining red cell deformability
Blood 51:693 (1978)
4. CRANDALL, E.D., CRITZ, A.M., OSHER, A.S.
Influence of pH on elastic deformability
Amer.J.Physiol. 235:C269 (1978)
5. DINTENFASS, L., BURNARD, E.D.
Effect of hydrogen ion concentration on the in-vitro
viscosity of packed red cells and blood at high haematocrits
Med.J.Australia 1:1072 (1966)
6. FISCHER, T.
Mechanisches Verhalten von Erythrozyten im Scherfeld zäher
Lösungen
Inaug.Diss. München (1978)
7. FISCHER, T., SCHMID-SCHÖNBEIN, H.
Tank tread motion of red cell membranes in viscometric
flow: Behavior in intracellular and extracellular
markers (with film)
Blood Cells 3:351 (1977)

8. GIOMBI, A., BURNARD, E.D.
Rheology of human foetal blood with reference to
haematocrit, plasma viscosity, osmolality and pH
Biorheology 6:315 (1970)
9. GROSS, G.P., HATHAWAY, W.E.
Fetal erythrocyte deformability
Pediat.Res. 6:593 (1972)
10. GUMMELT, M., UNGER, J., SCHEVEN, C., GEYER, G.
Deformability of erythrocytes incubated at various pH-
values
Acta Biol.Med.Germ. 40:379 (1981)
11. KLOSE, H.-J., KELSON, S., LINDERKAMP, O., RIEGEL, K., BETKE, K.
Microrheology of young and old red cells in childhood
iron deficiency and hemolytic anemias
Bibl.Anat. 20:178 (1981)
12. KLOSE, H.-J.
Die Verformbarkeit junger und gealterter Erythrozyten
bei angeborenen und erworbenen Anämien des Kindesalters
Habilitationsschrift München (1983)
13. LA CELLE, P.L., ARKIN, B.
Acquired rigidity: A possible determinant of normal RBC
life span
Blood 36:837 (1970)
14. LINDERKAMP, O., MEISELMAN, H.J.
Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties
of density-separated human red cells
Blood 59:1121 (1982)

15. LINDERKAMP, O., WU, P.Y.K., MEISELMAN, H.J.
Deformability of density separated red blood cells in
normal newborn infants and adults
Pediat.Res. 16:964 (1982)
16. LINDERKAMP, O., GÜNTNER, M., HILTL, W., VARGAS, V.M.
Erythrocyte deformability in the fetus, preterm, and
term neonate
Pediat.Res. 20:93 (1986)
17. MAGNUS, E.M.
Folate concentration in top, middle and bottom layer
of packed red cells in patients with vitamin B₁₂ de-
ficiency: Relation to treatment
Scand.J.Haematol. 24:243 (1980)
18. MEISELMAN, H.J., MERRILL, E.W., GILLILAND, E.R., PELLETIER,
G.A., SALZMAN, E.W.
Influence of plasma osmolarity on the rheology of human
blood
J.Appl.Physiol. 22:772 (1967)
19. MOHANDAS, N., CLARK, M.R., JACOBS, M.S., SHOHET, S.B.
Analysis of factors regulating erythrocyte deformability
J.Clin.Invest. 66:563 (1980)
20. MURPHY, J.R.
The influence of pH and temperature on some physical
properties of normal erythrocytes and erythrocytes from
patients with hereditary spherocytosis
J.Lab.Clin.Med. 69:758 (1967)

21. MURPHY, J.R.
Influence of temperature and method of centrifugation on
the separation of erythrocytes
J.Lab.Clin.Med. 82:334 (1973)
22. NAGASAWA, T.
Deformation of transforming red cells in various
pH solutions
Experienta 37:977 (1981)
23. NASH, G.B., MEISELMAN, H.J.
Red cell ageing: Changes in deformability and other
possible determinants of in vivo survival
Microcirculation 1:255 (1981)
24. NASH, G.B., MEISELMAN, H.J.
Red cell and ghost viscoelasticity
Effects of hemoglobin concentration and in vivo aging
Biophys.J. 43:63 (1983)
25. RAND, P.W., AUSTIN, W.H., LACOMBE, E., BARKER, N.
pH and blood viscosity
J.Appl.Physiol. 25:550 (1968)
26. SACHS, L.
Angewandte Statistik 6. Auflage
Springer-Verlag, Berlin (1984)
27. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., WELLS, R.
Fluid drop-like transition of erythrocytes under shear
Science 165:288 (1969a)

28. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., WELLS, R., SCHILDKRAUT, R.
Microscopy and viscometry of blood flowing under uniform shear rate (rheoscopy)
J. Appl. Physiol. 26:674 (1969b)

29. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., WELLS, R. E.
Rheological properties of human erythrocytes and their influence upon the "anomalous" viscosity of blood
Ergeb. Physiol. 63:146 (1971)

30. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., GOSEN, v. J., HEINICH, L., KLOSE, H.-J., VOLGER, E.
Technical report: A counter-rotating "Rheoscope-chamber" for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry
Microvascular Res. 6:366 (1973)

31. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., WEISS, J., LUDWIG, H.
A simple method for measuring red cell deformability in models of the microcirculation
Blut 26:369 (1973)

32. SHIGA, T., MAEDA, N., SUDA, T., KON, K., SEKIYA, M.
The decreased membrane fluidity of in vivo aged, human erythrocytes
Biochim. Biophys. Acta 553:84 (1979)

33. SMITH, B. D., LA CELLE, P. L.
Parallel decrease of erythrocyte membrane deformability and spectrin solubility at low pH
Blood 53:15 (1979)

34. SCHULZ, D., ROTHENHÖFER, C., FAUL, A.
Fraktionierung menschlicher Erythrozyten nach ihrem
Sedimentationsverhalten im Schwerfeld
Mschr.Kinderheilk. 126:607 (1978)

35. TAYLOR, G.I.
The formation of emulsions in definable fields of flow
Proc.Roy.Soc. London Ser.A 146:501 (1934)

36. TEITEL, P., NICOLAU, C.T.
Physico-chemical and metabolic factors influencing
the erythrocyte rheology
Proc.Symp.Mol.Biol.Pathol. Bucharest (1964)

37. TILLMANN, W., WAGNER, D., SCHRÖTER, W.
Verminderte Flexibilität der Erythrozyten von Neugeborenen
Blut 34:281 (1977)

38. TILLMANN, W., LEVIN, C., PRINDULL, G., SCHRÖTER, W.
Rheological properties of young and aged human erythrocytes
Klin.Wochenschr. 58:569 (1980)

39. USAMI, S., CHIEN, S., GREGERSEN, M.I.
Viscometric behavior of young and aged erythrocytes
In:Theoretical and Clinical Hemorheology
Eds.:Hartert, H.H., Copley, A.L. Springer, Berlin p 266 (1971)

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof.Dr. H.B. Hadorn für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung der Untersuchungen an der Universitäts-Kinderklinik.

Ganz besonders möchte ich Herrn PD Dr.H.J. Klose für die freundschaftliche Betreuung und die stets vorhandene Bereitschaft zur Diskussion anstehender Probleme danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof.Dr. K.P. Riegel und Herrn Prof.Dr. O. Linderkamp, die durch Bereitstellung von Räumlichkeiten, Geräten und fruchtbaren Diskussionen ein Gelingen der Arbeit ermöglichten.

Ein besonderer Dank gilt dem medizinisch-technischen Personal der Universitäts-Kinderklinik unter der Leitung von Herrn Prof.Dr. F. Bidlingmeier und Frau R. Hövel, die freundlich und geduldig meinen vielen Fragen entgegenkamen.

Zuletzt, und besonders hervorgehoben möchte ich mich bei Frau Monika Güntner bedanken. Mit Sachverstand und mit immerwährender Bereitschaft zu tatkräftiger Hilfe, hat sie maßgeblich zum Gelingen der Untersuchungen beigetragen.

Unausbleibliche Phasen der Stagnation ließen sich durch ihren Rat und ihre Hilfe stets schnell überwinden.

LEBENS LAUF

Name: Wolfgang-Stephan, Friedrich HILTL
geboren: 28.September 1953 in Füssen/Allgäu
Familienstand: verheiratet seit Mai 1982, ein Kind
Wohnort: 6900 Heidelberg, Fritz-Frey-Strasse 6
Schulausbildung: 1960-1964 Volksschule Füssen
1964-1969 Gymnasium Füssen
1969-1972 Realschule Füssen
Erwerb der mittleren Reife
Feb.1977-Jan.1978 Staatliches Kolleg Speyer
Feb.1978-Jul.1979 Staatliches Kolleg Oldenburg
Erwerb der allgemeinen Hochschul-
reife
Berufsausbildung: 1972-1973 Pflegepraktikum Krankenhaus Füssen
1973-1976 naturwissenschaftlich-technische-
Akademie Prof.Dr.Grübler Isny/Allgäu
Abschluß als staatlich geprüfter
medizinisch-technischer
Laboratoriumsassistent
1979-1985 Ludwig-Maximilians-Universität in
München, Studium der Humanmedizin
Nov.1985 Dritter Abschnitt der ärztlichen
Prüfung
Sept.1981 Beginn der Arbeit an der
Dissertation in der Universitäts-
Kinderklinik München
Berufstätigkeit: Sept.1981-Aug.1982 Tätigkeit als MTL im
Rahmen eines DFG-Projektes bei
PD Dr. H.J. Klose in der Univ.-
Kinderklinik München
Seit Feb.1986 wissenschaftlicher Angestellter
in der Abt. Neonatologie und
Intensivmedizin der Universitäts-
Kinderklinik Heidelberg

